

ІНСТРУКЦІЯ ПРО ВИКОРИСТАННЯ

DIA-SYPH

тест-система імуноферментна
для виявлення антитіл
до збудника сифілісу *Treponema pallidum*

Набір Т1-12

Т-0607С

ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір призначений для виявлення специфічних антитіл класів IgG, IgM, IgA до *Treponema pallidum* в сироватці або плазмі крові людини методом імуноферментного аналізу в тому числі на ранніх етапах інфекції.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА

Тест-система являє собою набір, що включає наступні компоненти: *імуносорбент* – полістироловий планшет, в лунках якого сорбовані рекомбінантні білки рTr17 та рTr47 – аналоги антигенів *Treponema pallidum*; *концентрат кон'югату* – суміш рекомбінантних білків рTr17 та рTr47, кон'югованих з пероксидазою хрому; *позитивний контроль* – очищені імуноглобуліни класу IgG людини, специфічні до *Treponema pallidum*; *негативний контроль* – сироватка крові людини, яка не містить антитіла до *Treponema pallidum*, а також поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) та антитіла до ВІЛ і вірусу гепатиту С; *концентрат розчину для промивання* – концентрат фосфатно-сольового буферу, містить детергент; *розчин для розведення кон'югату* – фосфатно-сольовий буфер, містить детергент, казеїнову фракцію білків молока, блок-компоненти, барвник і консерванти; *субстратний буфер* – цитратно-фосфатний буфер, що містить перекис водню; *хромоген* – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) в розчині; *стоп-реагент* – розчин сірчаної кислоти.

Зовнішній вигляд компонентів: *імуносорбент* – планшет, що складається з 12 стрипів по 8 лунок з можливістю відокремлення кожної лунки; *концентрат кон'югату* – червона з незначною опалесценцією рідина; *позитивний та негативний контроль* – світло-жовті з незначною опалесценцією рідини; *концентрат розчину для промивання* – безбарвна опалесцююча рідина, допускається розшарування та випадіння кристалічного осаду, що розчинюється при нагріванні; *розчин для розведення кон'югату* – фіолетова опалесцююча рідина; *субстратний буфер, розчин ТМБ, стоп-реагент* – прозорі безбарвні рідини.

Тест-система розрахована на проведення 96 аналізів, включаючи контроль, з можливістю використання планшета постріпово або використання частини стрипу на 12 постановок імуноферментного аналізу (12×8).

Принцип аналізу

Принцип аналізу DIA-SYPH базується на методі твердофазного ІФА „сендвіч”-варіанту і представляє собою одноетапну процедуру з одночасною інкубацією сироваток і кон'югату.

При внесенні в лунки кон'югату та зразків досліджуваних сироваток специфічні до *Treponema pallidum* антитіла у випадку їх наявності зв'язуються як з рекомбінантними антигенами на твердій фазі, так і з антигенами кон'югату, утворюючи комплекси антиген-антитіло. Після відмивання незв'язаних компонентів у лунки додають розчин проявника. Пероксидазну реакцію зупиняють, додаючи стоп-реагент, і вимірюють оптичну густину суміші в лунках (при довжині хвилі 450 нм), яка пропорційна концентрації специфічних до *Treponema pallidum* антитіл у зразках сироваток або плазми крові.

СКЛАД НАБОРУ

N	Назва компоненту	Кількість
1	Імуносорбент	1 планшет (12×8)
2	Концентрат кон'югату (11х)	1 ампл. × 1,0 мл
3	Позитивний контроль	1 ампл. × 1,0 мл
4	Негативний контроль	1 ампл. × 1,8 мл
5	Концентрат розчину для промивання (46х)	2 фл. × 25 мл
6	Розчин для розведення кон'югату	1 фл. × 12 мл
7	Субстратний буфер	1 фл. × 8 мл
8	Розчин ТМБ	1 фл. × 8 мл
9	Стоп-реагент	1 фл. × 15 мл
10	Клейка плівка	3 шт.

СПОСІБ ВИКОРИСТАННЯ

Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

- вода дистильована;
- перекис водню, 6 %;
- спирт етиловий, 70°;
- вата гігроскопічна;
- фільтрувальний папір;
- піпетки одноканальні (5-40, 20-200, 200-1000 мкл) та наконечники до них;
- піпетки 8-канальні (50-300 мкл) та наконечники до них;
- мірна склянка або циліндр (1000 мл);
- ванночки для реагентів;
- флакони для реактивів, 20 мл;
- сухоповітряний термостат;
- апарат для промивання планшетів (вошер);
- фотометр для вимірювання оптичної густини в планшетах;
- контейнер для збирання твердих забруднених відходів;
- контейнер для зливу забруднених рідин.

Необхідні застереження

Заходи безпеки при застосуванні набору:

- роботу проводити в спеціально обладнаному приміщенні;
- працювати в гумових рукавичках;
- не піпетувати розчини ротом;
- всі стічні розчини обробляти 6 % розчином перекису водню при кімнатній температурі протягом 3 годин;
- всі тверді відходи збирати в спеціальний контейнер, автоклавувати протягом 1 години при температурі 120°C;
- інструменти, обладнання, а також робочі поверхні протирати 70° етиловим спиртом.

Правила роботи з тест-системою:

- не використовувати набір після закінчення терміну придатності, не змішувати компоненти наборів різних серій;
- ретельно перемішувати реагенти при підготовці та проведенні аналізу;
- використовувати вимитий та сполоснутий дистильованою водою посуд для приготування реагентів;
- не допускати підсихання лунок на всіх етапах постановки ІФА;
- перевіряти точність дозування, слідкувати за робочим станом піпеток та іншого обладнання;
- уникати попадання прямих сонячних променів на робочу поверхню під час проведення аналізу.

Підготовка зразків

Зразки сироваток чи плазми крові зберігають при температурі 2-8°C не більше 72 годин. Допускається заморожування зразків (бажано до температури нижче -20°C) не більше двох разів. Необхідно освітлювати зразки сироваток (плазми), які містять агрегати та осад, за допомогою центрифугування.

Зразки з азидом натрію, гемолізом, гіперліпідемією або бактеріальним проростанням не придатні для аналізу.

Проведення аналізу

1 Підготовка до аналізу (з розрахунку на 8 лунок)

Витримують компоненти набору при температурі 18-25°C протягом 30 хвилин.

1.1 Приготування розчину для промивання

Вміст одного флакону концентрату розчину для промивання інтенсивно потрушують. Відбирають 4 мл розчину і розводять в 180 мл дистильованої води, перемішують. Якщо концентрат розчину містить кристали, його прогрівають перед використанням при 35-37°C до повного розчинення кристалів.

Розчин можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 10 діб.

1.2 Приготування розчину кон'югату

В чистий флакон відбирають 0,7 мл розчину для розведення кон'югату та додають 70 мкл концентрату кон'югату. Вміст флакону ретельно перемішують, не допускаючи піноутворення.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

1.3 Приготування розчину ТМБ субстрату

В чистий флакон відбирають 0,5 мл хромогену ТМБ і додають 0,5 мл субстратного буфера, суміш інтенсивно потрушують.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

Розчин ТМБ субстрату необхідно захищати від попадання прямого світла та контакту з металами або іонами металів. Перед використанням розчин ТМБ субстрату повинен бути безбарвним.

2 Промивання планшету

2.1 На етапі промивання планшету слід дотримуватися пунктів інструкції. Неякісне промивання планшету призводить до отримання некоректних результатів.

2.2 Для промивання планшету рекомендується використовувати автоматичний промивач – вошер, у випадку відсутності вошера або його поганої роботи можна промивати лунки 8-канальною піпеткою; на всіх етапах промивання необхідно контролювати заповнення лунок та повну аспірацію (видалення) рідини з них.

2.3 При кожному циклі промивання планшету дотримуйтесь наступної процедури:

- видалити вміст лунок;
- заповнити лунки планшету розчином для промивання (350 мкл в лунку), без переповнення та перетікання рідини з сусідніх лунок;
- витримайте лунки з розчином для промивання протягом 40-60 секунд;
- видалити розчин з лунок.

2.4 Після закінчення промивання планшету слід позбавитись зайвої вологості (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).

3 Проведення аналізу

Увага! Необхідно суворо дотримуватись правил промивання планшету згідно пункту 2 (Промивання планшету).

- Готують розчин для промивання згідно п. 1.1.
- Готують розчин кон'югату згідно п. 1.2.
- Звільняють планшет від упаковки.
- В лунки вносять по 60 мкл розчину кон'югату.
- Додають в лунки по 30 мкл зразків досліджуваного сироваток, залишивши вільними 5 лунок першого ряду (лунки для контролю).
- В дві лунки (A1-B1) вносять 30 мкл позитивного контролю, а в три лунки (C1-E1) – по 30 мкл негативного контролю.

Обережно піпетують суміш в лунках (під час піпетування відбувається зміна кольору розчину в лунках).

- Накривають планшет клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 37 °C протягом 60 хвилин.
- Після закінчення інкубації аспірують розчин реагентів з лунок та промивають лунки вісім разів розчином для промивання, як описано в пункті 2 (Промивання планшету).
- Готують розчин ТМБ субстрату згідно п. 1.3.
- Вносять в лунки по 100 мкл розчину ТМБ субстрату.
- Накривають планшет новою клейкою плівкою або кришкою та інкубують його при температурі 18-25 °C в темному місці протягом 30 хвилин.
- Зупиняють кольорову реакцію внесенням до всіх лунок по 100 мкл стоп-реагенту.
- Не більше як через 5 хвилин після зупинення кольорової реакції визначають оптичну густину (ОГ) у двоххвильовому режимі (450 нм відносно 620 нм).

ОГ можна визначати в однохвильовому режимі (450 нм) відносно порожньої лунки (бланк). Необхідно передбачити порожню лунку в планшеті при аналізі. При роботі в однохвильовому режимі знижується чутливість та точність аналізу.

ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ АНАЛІЗУ

- Розраховують середнє значення оптичної густини для лунок негативного контролю (ОГсер К-) та позитивного контролю (ОГсер К+).
- Проведення аналізу вважають коректним, якщо ОГсер К- не вище 0,1 оптичної одиниці (ОО), а ОГсер К+ не нижче 0,6 ОО.
- Якщо одне з трьох значень ОГ К- більше 0,1 ОО, або більше ніж в два рази перевищує ОГсер К-, його відкидають і ОГсер К- розраховують за рештою значень ОГ К-.
- Граничне значення ОГ (ГЗ). ГЗ розраховують, додаючи константну величину **0,2** до значення ОГсер К-.
- "Сіра зона" - зона значень ОГ, від ГЗ до значень ОГ менших ГЗ на 10%.
- Результати аналізу вважаються **негативними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка менше нижнього рівня ОГ "сірої зони".
- Результати аналізу вважаються **позитивними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка більше ГЗ.
- Зразки, які мають значення ОГ в межах "сірої зони" вважаються **невизначеними**.
- Зразки, що дали позитивний або невизначений результат, необхідно досліджувати повторно не менш ніж в двох лунках тест-системи:
 - зразки позитивні в одній або більше лунках слід вважати позитивними;
 - зразки негативні в двох або більше лунках слід вважати негативними.

Всі зразки, що при повторному аналізі виявили себе як позитивні, мають бути перевірені підтверджувальними методами.

УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ І ТРАНСПОРТУВАННЯ

Набір зберігають і транспортують при температурі 2-8°C. Заморожувати набір не дозволяється.

ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

Термін придатності набору – 1 рік 2 місяці.

ФОРМА ВИПУСКУ – тест-набір.

Код АТС – V04CX.

ПАКУВАННЯ

- Імуносорбент вкладений в пакет з багатощарової та комбінованої плівки; пакет термозапаляний.
- Кон'югат, позитивний контроль, негативний контроль розлиті в пластикові ампули об'ємом 0,5 мл або 2,0 мл.
- Розчини, крім розчину ТМБ, розлиті у пластмасові флакони об'ємом 30 мл або 35 мл.
- Розчин ТМБ розлитий у флакони з пластмаси коричневого кольору об'ємом 15 мл.
- Набір компонентів разом з інструкцією з використання поміщений в коробку з гофрокартону з пластиковою вставкою.

ВИРОБНИК

АТЗТ НВК „Діапроф-Мед“, 04123, Україна, м. Київ, вул. Світлицького, 35.

За довідками звертайтеся по тел./факсу (044) 433-75-82, 433-02-22 або e-mail: tech@diapr.kiev.ua.

Рекламації на якість наборів надсилайте до ДП "Центр імунологічних препаратів" за адресою: 03038, Україна, м. Київ, вул. М. Амосова, 5, тел. (044) 275-24-66, 275-07-02 та підприємству-виробнику.

У випадку порушення умов зберігання, транспортування та схеми постановки ІФА з вини споживача рекламації розглядаються як необґрунтовані.